

# **ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА СООТНОШЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ, ВЫЗВАННОГО АЦЕТИЛХОЛИНОМ ЭНДОТЕЛИЙЗАВИСИМОГО РАССЛАБЛЕНИЯ ИЗОЛИРОВАННОГО КОЛЬЦА АОРТЫ КРЫС**

**Лазуко С.С., Солодков А.П.**

***Витебский государственный медицинский университет,  
центральная научно-исследовательская лаборатория, Витебск***

The aim of this article - to detect the influence of immobilization stress on contribution released by endothelium prostaglandin, nitric monoxide, KIR channels and endothelium – dependent hyperpolarization in the origin of relaxation of smooth muscles of isolated rat aorta ring (Wistar) evoked by acetylcholine. The experiments have been conducted on 18 preparations of isolated rat aorta rings. The stress has been evoked by fixation the animals on the back within 6 hours.

The results have been expressed as percent of dilatation from the value of contraction received after the injection of PGF2 $\alpha$  and KCl. Ions of Barium (2\*10<sup>-6</sup> M) added to perfused solution in order to detect the role of inwardly rectifying potassium channels in tone modulation of smooth muscles, hyperpolarization of endothelium and smooth muscle has been prevented by pre-contraction of aorta ring KCl (68mM).

Under the influence of PGF2 $\alpha$  and KCl the growth of tension of stressed rat aorta ring segment - in 38% less than in control (1009 +- 74 mg versus 1608+- 85%mg in control for PGF2 $\alpha$  and 1065 +- 137 mg versus 1697 +-147mg in control for KCl).

After stress the combination of PGF2 $\alpha$  and barium the tension growth of aorta smooth muscle in comparison with the action of PGF2 $\alpha$  increased in 38% (14% in control). In segments of rat aorta underwent by stress after blocker NO synthesis and prostaglandins the growth of tension evoked by PGF2 $\alpha$  has been observed in 23% less than in control. Under the influence of barium the tension growth of isolated aorta ring increased in 24 % (no changes in control).

In aorta ring segment of rat underwent 6 – hours immobilization stress (on the base of pre- contraction KCl evoked by acetylcholine dilatation has been expressed in the same degree as in control).

However after pre-contraction PGF2 $\alpha$  endothelium – dependent relaxation of aorta ring stressed rats is more expressed than in control and it appeared in lower concentration of acetylcholine.

The addition of barium ions the similar interrelationship of stress and control but they were not trustworthy. The expression of endothelium – dependent dilatation stays on the previous level 52-48%.

Blockade of NO synthesis and prostaglandins eliminated stress effect, relaxation effect was minimum and there was no any difference between groups.

In addition of ions of barium in solution contained L-NAME and indomethacine the relaxation effect of acetylcholine is appeared in more degree.

So, the level of tension observed after PGF<sub>2α</sub> injection in the conditions as intact as blocked system of NO synthesis and prostaglandins is the sequence of its direct influence on smooth muscle cells. The level of basal releasing of NO, prostaglandins and hyperpolarization (sensitive to the low concentration of barium ions and KCl), appeared on the membranes of smooth muscles has contracted.

Under the influence of stress not only endothelial NO releasing is raised and the role of KIR potassium channels of smooth cells is increased.

NO, эйкозаноиды и/или эндотелиальный фактор гиперполяризации (EDHF) были идентифицированы, как главные релаксирующие факторы эндотелиального происхождения. Высвобождающиеся из эндотелиоцитов ионы  $K^+$ , продукты P-450 монооксигеназного пути (ЕЕТ), пероксид водорода и др. субстанции способны вызывать гиперполяризацию подлежащих гладкомышечных клеток, активируя Kir-каналы,  $Na^+/K^+$  АТФ-азу и/или  $BK_{Ca}$  (кальцийактивируемые калиевые каналы большой проводимости), обнаруженные в их мембране. В изолированном кольце аорты крысы основным веществом, высвобождающимся из эндотелиоцитов, является оксид азота [7]. Образующийся под влиянием NO ц-ГМФ в некоторых сосудах также способен активировать калиевые каналы. Следовательно, наблюдаемое при активации гладкомышечной клетки увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция, может сопровождаться открытием, содержащихся в их мембране,  $BK_{Ca}$ -каналов, что приведет к выходу ионов калия из клетки и созданию окружающего ее «калиевого облака» [1]. В результате этого, частично инактивируются потенциалзависимые кальциевые каналы, уменьшается вход  $Ca^{2+}$ , что неминуемо будет сопровождаться ослаблением сократительного ответа. В появлении подобного калиевого тока, по-видимому, важную роль должны играть и активирующиеся ионами калия, а также при гиперполяризации Kir-каналы, экспрессируемые в мембране гладкомышечных клеток.

Известно, что избыточная продукция NO может приводить к угнетению сердечной деятельности, вазоконстрикторных реакций на адренореактивные стимулы и глубокому, нередко необратимому падению

артериального давления не только при септическом [8], анафилактическом [3], кардиогенном [5], геморрагическом [2], тепловом [6] и других видах шока, но и при стрессе [9]. Не исследованным остается вопрос о влиянии длительного стрессорного воздействия на вклад чувствительных к малой концентрации ионов бария внутренне очищающих калиевых каналов (Kir), в развитие постстрессорных изменений эндотелийзависимого расслабления и сократительной активности гладкой мышцы.

Целью настоящей работы было выяснить влияние иммобилизационного стресса на вклад высвобождаемых эндотелием монооксида азота, простагландинов, а также (Kir) каналов в возникновении вызванной ацетилхолином релаксации гладких мышц изолированного кольца аорты крыс линии Вистар.

#### *Материалы и методы исследования*

Опыты были проведены на 18 препаратах изолированного кольца аорты крыс линии Вистар. Животных разделяли на две группы: контрольные (n=8) и перенесшие стресс (n=10). Стресс вызывали фиксацией крыс на спине в течение 6 часов. После чего их освобождали и на 90 минут помещали в клетку.

При проведении исследований на изолированном кольцевом сегменте аорты один его конец жестко фиксировали, а другой прикрепляли к рычажку датчика силы - механотрону 6MX1C. Препарат функционировал в изометрическом режиме [4]. Приготовленный таким образом кольцевой сегмент помещали в термостатируемую ванночку, заполненную раствором Кребса-Хензелейта (pH-7.4,  $t=37^{\circ}\text{C}$ , 95%  $\text{O}_2$  и 5%  $\text{CO}_2$ ). Исходное напряжение кольца аорты равнялось приблизительно 2 г. Состояние стимулируемой продукции NO и простагландинов (простациклина) эндотелием изолированного кольца аорты оценивали по величине реакции расслабления, возникающей в ответ на кумулятивное введение в питательную жидкость ацетилхолина ( $10^{-10}$ - $10^{-5}$  М), на фоне предварительного сокращения, вызванного стандартной дозой ( $4 \cdot 10^{-6}$  М) простагландина F2a (PGF2 $\alpha$ ) до и после введения в перфузионный раствор блокатора синтеза NO L-NAME ( $10^{-4}$  мкМ) и циклооксигеназы индометацина ( $10^{-5}$ М). Результаты выражали как процент расслабления от величины сокращения, полученной после введения PGF2  $\alpha$  или хлористого калия. Для выяснения роли внутренне очищающих калиевых каналов (Kir) в модуляции тонуса гладкой мышцы в перфузионный раствор добавляли ионы бария ( $2 \cdot 10^{-6}$  М), а гиперполяризацию эндотелия и гладких мышц устраняли предсокращением кольца аорты KCl (68мМ). Цифровой материал был обработан методом вариационной статистически с использованием критерия Стьюдента.

### *Результаты и их обсуждение*

В группе животных, перенесших 6-часовую иммобилизацию, исходное напряжение кольца аорты было таким же как в контроле ( $1923 \pm 53$  мг против  $1895 \pm 38$  мг в контроле). Под влиянием  $\text{PGF2 } \alpha$  и  $\text{KCl}$  прирост напряжения сегмента аорты стрессированных крыс оказался на 38% меньше, чем в контроле ( $1009 \pm 74$  мг против  $1608 \pm 85$  мг в контроле для  $\text{PGF2 } \alpha$  и  $1065 \pm 137$  мг против  $1697 \pm 147$  мг в контроле для  $\text{KCl}$ ). После перенесенного стресса, сочетание  $\text{PGF2 } \alpha$  и бария, увеличивало прирост напряжения гладкой мышцы аорты, по сравнению с действием  $\text{PGF2 } \alpha$  не на 14%, как в контроле, а на 38%. в сегментах аорты крыс, перенесших стресс. После добавления в раствор Кребса блокатора синтеза  $\text{NO}$  и простагландиннов наблюдался вызванный  $\text{PGF2 } \alpha$  прирост напряжения на 32% меньше, чем в контроле. Под влиянием бария прирост напряжения изолированного кольца аорты возрастал на 24%, в то время как в контроле он практически не изменялся.

Под влиянием ацетилхолина возникала эндотелийзависимая релаксация кольца аорты, предварительно сокращенного как  $\text{PGF2 } \alpha$ , так и  $\text{KCl}$ . В контроле наиболее выраженное расслабление ацетилхолин вызывал в препаратах предварительно сокращенных  $\text{PGF2 } \alpha$  ( $4 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ). При концентрации ацетилхолина в ванночке  $10^{-6} \text{M}$  оставалась только 57% от сокращения, вызываемого  $\text{PGF2 } \alpha$ . На фоне предсокращения  $\text{KCl}$ , расслабление сегмента аорты достигало всего лишь 84%, что на 27% было меньше, чем в условиях предсокращения  $\text{PGF2 } \alpha$ . При сочетанном действии  $\text{PGF2 } \alpha$  ( $2 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ) и ионов  $\text{Ba}^{2+}$ , а также в условиях действия индометацина в ответ на ацетилхолин возникало расслабление подобное тому, которое наблюдается при действии только  $\text{PGF2 } \alpha$ . Сочетание блокаторов синтеза простагландиннов и  $\text{NO}$  приводило к тому, что расслабление сегмента аорты в ответ на ацетилхолин составляло всего лишь 5-7%. Добавление в этих условиях ионов бария не оказывало существенного влияния.

В сегментах аорты крыс, перенесших 6-ти часовой иммобилизационный стресс, на фоне предсокращения  $\text{KCl}$  (68мМ) вызываемая ацетилхолином релаксация была выражена в той же степени, как и в контроле. Однако после предсокращения  $\text{PGF2 } \alpha$  эндотелийзависимая релаксация аорты стрессированных крыс оказалась достоверно большей, чем в контроле и появлялась при более низких концентрациях ацетилхолина. Добавление ионов бария сохраняло подобные взаимоотношения стресса и контроля, но они были не достоверными, хотя выраженность эндотелийзависимой дилатации оставалась прежней 52-48%. Блокада синтеза  $\text{NO}$  и простагландиннов также устраняла эффект стресса, а релаксирующий эффект был минимальным и не различался между группами. При добавлении в раствор, содержащий  $\text{L-NAME}$ ,

индометацин и ионы бария, вновь проявился достоверно больший релаксирующий эффект ацетилхолина.

Следовательно, в изолированном кольце аорты релаксирующий эффект NO и простаглицина, высвобождаемых под влиянием ацетилхолина, эффективно устранялся L-NAME и индометацином. Эта релаксация не ослаблялась низкой концентрацией ионов бария и существенно подавлялась хлористым калием. В тоже время, в условиях блокады синтеза NO и простаглицидов, ацетилхолин вызывал незначительную релаксацию гладкой мышцы сегмента аорты. Под влиянием иммобилизационного стресса NO-зависимая релаксация сегмента аорты усиливалась, причем это усиление наблюдалось как в условиях интактного, так и блокированного синтеза NO.

Обращает на себя внимание тот факт, что ионы бария существенно увеличивали констрикторную активность  $\text{PGF2}\alpha$  и не оказывали влияния на вызванную ацетилхолином эндотелийзависимую релаксацию гладких мышц аорты крыс линии Вистар. Это позволяет предположить, что, вызываемое  $\text{PGF2}\alpha$  увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция в гладкомышечных клетках, по-видимому, активирует  $\text{K}^+_{\text{ir}}$  калиевые каналы, что в свою очередь, сопровождается развитием гиперполяризации мембраны гладкомышечных клеток, которая ослабляет констрикторный эффект  $\text{PGF2}\alpha$ .

Релаксирующее же действие ацетилхолина реализуется посредством воздействия на эндотелиоциты. Оно связано с увеличением внутриэндотелиальной концентрации ионов кальция и высвобождением NO и простаглицина и, по-видимому, практически не модулируется изменением состояния как активируемых кальцием, так и  $\text{K}^+_{\text{ir}}$  каналов. Это может быть обусловлено тем фактом, что  $\text{K}^+_{\text{ir}}$  калиевые каналы плохо представлены в эндотелиоцитах.

Таким образом, можно предположить, что снижение сократительной активности гладкой мышцы аорты не однозначно связано с усилением продукции NO и/или простаглицидов. Вероятно, при этом существуют как изменения состава метаболитов, высвобождаемых из эндотелия, так и свойства самих гладкомышечных клеток. Последнее предположение нашло подтверждение в том, что после перенесенной иммобилизации в условиях блокады синтеза NO и простаглицидов под влиянием бария прирост напряжения изолированного кольца аорты возрастало на 24%, в то время как в контроле оно практически не изменялось. Следовательно, уровень напряжения, наблюдаемый после введения  $\text{PGF2}\alpha$  в условиях как интактных, так и блокированных систем синтеза NO и простаглицидов, является следствием его прямого влияния на гладкомышечные клетки, которому противодействует уровень базального высвобождения NO, простаглицидов и чувствительная к низкой концентрации ионов бария и хлористому калию гиперполяризация, возникающая на мембранах гладких

мышц. Под влиянием стресса возрастает высвобождение не только эндотелиального NO, но и роль Kir калиевых каналов гладкомышечных клеток.

#### *Литература*

1. Edwards G., R.R. Gillian, M.J. Gardener et al. Roles of the inward-rectifier  $K^+$  channel and  $Na^+/K^+$ -ATP-ase in the hyperpolarization to  $K^+$  in rat mesenteric arteries // EDHF 2002. –2003 – P.309-317.
2. Koch M.A., Hasser E.M., Schadt J.C. Influence of nitric oxide on the hemodynamic response to hemorrhage in conscious rabbits // Am. J. Physiol. – 1995.
3. Mitsuhashi H., Takeuchi H., Saitoh J. et al. An inhibitor of nitric oxide synthase, N(omega)-nitro-L-arginine-nethyl ester, attenuates hypotension but does not improve cardiac depression in anaphylaxis in dogs // Shock. – 1995. - Vol.3. - P.447-453.
4. Блатнер Р., Классен Х., Денерт Х. и др. Эксперименты на изолированных препаратах гладких мышц // М.:Мир. - 1983.- С.208.. - Vol.37. – P.R171-R182.
5. Ванин А.Ф., Манухина Е.Б., Лапшин А.В. и др. Усиление синтеза оксида азота в стенке аорты при экспериментальном инфаркте миокарда // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1993б. - №8. - С.142-144.
6. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю., Микоян В.Д. и др. Увеличение продукции оксида азота в органах крысы при тепловом шоке // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1996б. - №5. - С.520-523
7. Солодков А.П., Божко А.П. К механизму влияния малых доз тиреоидных гормонов на стрессорные изменения тонуса сосудов // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 1995. – Т.81, №12. – С.95-100.
8. Стокле Ж.-К., Мюллер Б., Андрианцитохайна Р., Клещев А. Гиперпродукция оксида азота в патофизиологии кровеносных сосудов // Биохимия. – 1998. – Т.7. – С.976-983.
9. Ульянинский Л.С., Медведев О.С., Бунятян А.М. и др. Изменение гемодинамики при иммобилизационном стрессе // Бюлл. эксперим. биол. мед.- 1985.- N 9.- С.262-265.

### **ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ОКСИДА АЗОТА В ПОВРЕЖДЕНИИ ЭНДОТЕЛИЯ У КРЫС С ИШЕМИЕЙ-РЕПЕРFUЗИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

**Максимович Н. Е.**

*Государственный медицинский университет, г. Гродно*

The contribution of neuronal and extraneuronal sources of nitric oxide in morfolological injury of endothelium in rats with brain ischemia-reperfusion was